

ヨーネ菌実験感染マウスモデルの肉芽腫形成に関する病理学的検討

田 中 省 吾

Studies on granuloma formation in mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Shogo TANAKA

ウシのヨーネ病は、*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) 感染に起因する疾病で、臨床的に慢性持続性の下痢や消瘦を主徴とし、病理組織学的には肉芽腫性腸炎や肉芽腫性リンパ節炎を特徴としている。本病は、1895年に初めて論文に記載されて以来、今や全世界の畜産国への蔓延が推測され、我が国の畜産界においても重要損耗疾病として認識されている。実用的で有効なヨーネ病の新しい早期診断法、さらには予防法の開発には、ヨーネ病の病理発生機序を解明することが必要不可欠であるが、未だ不明な点が数多い。ヨーネ病の病理発生機序の解明を困難にしてきた原因の一つは、適当な実験小動物モデルが存在しなかったことであり、今日までヨーネ病感染モデルの確立を目的として様々な実験小動物を用いた感染実験が試みられてきた。マウスは、他の実験小動物に比較して感受性が高いが、系統間で感受性が大きく異なることや病変形成に長時間を要することから、より感受性が高く早期に確実に病変を再現できるマウス系統を見だし、実験感染時に用いたヨーネ菌の由来、接種法および接種生菌数を明確にしてヨーネ病実験感染モデルとして確立することが期待されてきた。また近年、近交系マウスのヨーネ菌に対する感受性が、第1染色体上に存在する*Bcg*遺伝子に支配されることが報告され、哺乳動物の抗病性を支配する遺伝的形質が一躍注目されてきた。

そこで本研究では、ヨーネ菌実験感染モデルの確立を目的として、対立する*Bcg*遺伝子型を持つ近交系BALB/cマウス(感受性)とC3H/HeJマウス(抵抗性)にヨーネ菌感染実験を試み、*Bcg*遺伝子に支配される免疫応答の系統間差異を病理組織学的に検討した。また形成される病変の系統間差異を組織化学的、超微細形態学および免疫組織学的手法により比較した。さらにウシ

の腸管粘膜に多数分布する型T細胞が、ヨーネ菌に対するウシの高感受性にどのような役割を果たしているのかを解明するため、感受性系統BALB/cマウスから作出した型T細胞欠損ミュータントマウスにヨーネ菌感染実験を試み、型T細胞の欠損による肉芽腫形成および菌増殖性への影響を検討した。

第一章 近交系マウスによるヨーネ病実験感染モデルの確立

ヨーネ菌感染に対する感受性を比較するため、対立する*Bcg*遺伝子型を有する近交系BALB/cマウスとC3H/HeJマウスにヨーネ菌ATCC19698株生菌(5×10^8 CFU/頭)を腹腔内接種し、形成される病変を病理組織学的に比較した。また肝臓と脾臓の病変では、両マウス系統間における肉芽腫面積の差異を形態計測学的に解析した。

BALB/cマウスでは、類上皮細胞や多核巨細胞からなる類上皮細胞肉芽腫の形成が肝臓、脾臓、膵臓、子宮、胸腺、肺および心臓の多種臓器に認められ、肝臓と脾臓の肉芽腫面積および菌数は、菌接種後32週まで漸次増加した。また、ウシのヨーネ病でみられるような腸管粘膜固有層やパイエル板における類上皮細胞肉芽腫の形成が、菌接種後6週以降に認められた。一方、C3H/HeJマウスの病変は、多核巨細胞の出現が希で類上皮細胞の数が少なく、マクロファージと多数のリンパ球からなる肉芽腫であり、肝臓、脾臓、膵臓および肺にみられたが、腸管では認められなかった。さらに肝臓と脾臓に形成された肉芽腫面積は、菌接種後6週以降に縮小し、菌接種後32週の病変内の菌数もBALB/cマウスに比べて有意に少なかった。以上の結果から両系統マウスは、ヨーネ病における生体の防御機構および遺伝子による抗病性の調節機構を解明する上で簡便かつ有効な実験感染モデルとなることが明らかにされた。

第二章 ヨーネ病実験感染モデルにみられた肉芽腫性病変の組織化学, 超微細形態学および免疫組織学的比較

ヨーネ病実験感染モデルとして確立した感受性系統BALB/cマウスと抵抗性系統C3H/HeJマウスにおける感受性差異の機序を明らかにするため,肉芽腫内のマクロファージ系細胞の活性を酸性フォスファターゼの局在を指標として系統間で比較し,肉芽腫の超微細形態学的差異についても検索した。また,マウス系統間の病変形成過程におけるTリンパ球,Bリンパ球およびマクロファージの動態を免疫組織学的に比較するとともに肉芽腫内のマクロファージ系細胞についてMHC class II抗原提示能を検索した。

菌接種後3週の肝臓と脾臓で検出された酸性フォスファターゼは,C3H/HeJマウスに比べBALB/cマウスでより高い傾向にあった。しかし,BALB/cマウスでは,肉芽腫面積の拡大に伴って肝臓で3週以降,脾臓で6週以降に酸性フォスファターゼが減少した。また,BALB/cマウスの類上皮細胞内では,小型でライソゾーム酵素が少ない多数のファゴライソゾーム内に菌が増殖していた。一方,C3H/HeJマウスでは,菌接種後9週以降に肝臓と脾臓における肉芽腫性病変の退縮に伴って局在する酸性フォスファターゼが漸次増加する傾向にあり,類上皮細胞内に大型でライソゾーム酵素を多量に含み,変性した菌を内包したファゴライソゾームが観察された。さらに両マウス系統の脾臓を免疫組織学的に比較するとBALB/cマウスでは,菌接種後9週までに白脾髄と赤脾髄において類上皮細胞肉芽腫の拡大に伴ってBリンパ球,CD4⁺およびCD8⁺Tリンパ球がともに減少していた。一方,C3H/HeJマウスの白脾髄では,ヨーネ菌感染後9週までTリンパ球に有意な変動がみられなかったが,感染後早期に肉芽腫病変が出現する赤脾髄においては,CD4⁺Tリンパ球が感染後3週に,CD8⁺Tリンパ球は,感染後6週に有意な増加がみられた。類上皮細胞のMHC class II抗原の発現は,細胞内で菌が増殖したBALB/cマウスでは弱く,菌の少ないC3H/HeJマウスでは,強い傾向がみられた。両マウス系統間にみられたこれらの感受性差異は,ヨーネ菌を貪食したマクロファージの抗原提示機能の低下とそれに伴うTリンパ球による細胞性免疫の誘導低下に起因し,ヨーネ菌侵襲後の類上皮細胞内での殺菌能低下が菌増殖とそれに反応する肉芽腫の拡大を誘導することが明らかになった。一方,C3H/HeJマウスのヨーネ菌感染に対する強い抵抗性は,ヨーネ菌感染の局所におけるCD4⁺およびCD8⁺Tリンパ球による細胞性免疫の活性化とそれに誘導されるマクロファージ内での酵素産生亢進による殺菌能の活性化に起因し,菌を殺菌・排除して病変修復に向かうことが判明した。

第三章 ヨーネ菌感受性マウスの肉芽腫形成における型T細胞の役割

ウシの腸管粘膜には,ヒトやマウスに比べて多数の型T細胞が分布しており,ヨーネ菌感染に対するウシの高い感受性が型T細胞に関連があるかどうかを明らかにするため,感受性系統BALB/cマウスから作出された型T細胞欠損ミュータントマウス(ミュータントマウス)と野生型BALB/cマウスにヨーネ菌ATCC19698株生菌(多量接種群;4×10⁸CFU/頭,少量接種群;4×10⁶CFU/頭)を腹腔内接種し,肉芽腫形成と菌増殖における型T細胞の役割について病理組織学的に検索するとともに肝臓に形成される肉芽腫面積について形態計測学的に解析した。また両マウスの脾臓におけるヨーネ菌の増殖性を比較した。

野生型BALB/cマウスでは,胸腺や腸管のパイエル板などの胸腔内および腹腔内の多種臓器に類上皮細胞肉芽腫の形成がみられ,肝臓の肉芽腫面積は接種菌量および接種後の経過時間に伴って拡大した。一方,ミュータントマウスでは,胸腺とパイエル板には病変が見られず,肝臓の肉芽腫面積も菌接種後18週までに縮小する傾向にあった。さらにミュータントマウスの病変は,類上皮細胞や多核巨細胞の出現を伴わず,リンパ球が著明に浸潤する特異な肉芽腫像を呈していた。脾臓における菌の増殖は,型T細胞の存在の有無に関わらず,いずれのマウスでも菌接種後18週まで有意に増加していた。しかし,菌を多量接種したミュータントマウスでは,野生型マウスに比較して菌数が少なかった。以上の結果,ヨーネ菌接種後に野生型BALB/cマウスにみられたウシのヨーネ病と同様の広範な類上皮細胞肉芽腫の形成には,

型T細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方,菌増殖の抑制に対する型T細胞の直接的な関与は薄いものと考えられた。肉芽腫の形成は,細胞性免疫における重要な免疫応答である。しかし,ヒトやマウスに比べて特に多く分布する反芻獣の腸管の型T細胞は,ヨーネ菌感染において殺菌よりむしろ無秩序な類上皮細胞肉芽腫の形成を誘導して正常な腸管組織の構築を破壊し,機能を阻害することによって下痢などの臨床症状を起こす要因になっており,反芻獣のヨーネ菌に対する感受性の高さに関与していることが考えられた。

これらの結果は,遺伝子的人為的操作によってヨーネ病に対して抗病性を有するウシを作出する可能性を探り,ヨーネ病の病理発生機構を応用した粘膜ワクチン等の新しい早期診断・予防法を開発する上で有用な知見になるものと思われる。